

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類 5</b> <b>G01N 33/579</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO 92/03736</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1992年3月5日 (05.03.1992)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP91/011118 <b>(22) 国際出願日</b> 1991年8月22日 (22.08.91)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平2/218954 1990年8月22日 (22.08.90) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 生化学工業株式会社 (SEIKAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 田中重則 (TANAKA, Shigenori) [JP/JP] 〒187 東京都小平市小川西町5丁目3番15号 Tokyo, (JP) 田村弘志 (TAMURA, Hiroshi) [JP/JP] 〒207 東京都東大和市立野3丁目1293番10号 グリーンタウン 2号棟408号室 Tokyo, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 秋野 平, 外 (HAGINO, Taira et al.) 〒100 東京都千代田区霞が関3丁目8番1号 虎の門三井ビル14階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)	<b>(81) 指定国</b> AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IT (欧州特許), LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54) Title : ASSAYING AGENT FOR ENDOTOXIN</b>  <b>(54) 発明の名称</b> エンドトキシンの測定剤  <b>(57) Abstract</b>  An assaying agent for endotoxin, which comprises either a limulus amoebocyte lysate and antibody against a (1 → 3)-β-D-glucan-sensitive factor or a limulus amoebocyte lysate which is substantially free from said factor. As this agent makes it possible to assay with high sensitivity an endotoxin originating in Gram-negative bacteria present in a biological specimen such as blood, urine or cerebrospinal fluid without being affected by (1 → 3)-β-D-glucan, it serves to diagnose gram-negative bacterial sepsis or other diseases which have been difficult to diagnose rapidly with good reproducibility, thus greatly contributing to clinical examination in particular.		

(57) 要約

本発明は、カプトガニ・アメボサイト・ライセートと、  
(1 → 3) - β - D - グルカン感受性因子に対する抗体とからなるか、または、(1 → 3) - β - D - グルカン感受性因子を実質的に含まないライセートからなるエンドトキシンの測定剤を提供するものであり、(1 → 3) - β - D - グルカンの影響を受けずに、血液や尿、髄液等の生体試料中に存在するグラム陰性菌由来の該エンドトキシンを極めて高い感度で測定できるので、診断困難なグラム陰性菌敗血症等を再現性よく迅速に診断できるので、特に臨床検査医学に貢献するところ大である。

付録としての用途のみ

PCTに基いて公開される国際出口のパンフレット第1頁にPCT協定国を特定するために使用されるコード

AT オーストリア  
AU オーストラリア  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ共和国  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コート・ジボアール  
CM カメルーン  
CS チェコスロバキア  
DE ドイツ  
DK デンマーク

ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GI ギニア  
GB イギリス  
GR ギリシャ  
HU ハンガリー  
IT イタリア  
JP 日本  
KP 朝鮮民主主義人民共和国  
KR 大韓民国  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリランカ  
LU ルクセンブルグ  
MC モナコ  
MG マダガスカル

ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
PL ポーランド  
RO ルーマニア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SN セネガル  
SU ソビエト連邦  
TD チャド  
TG トーゴ  
US 米国

## 明 細 書

## エンドトキシンの測定剤

5

## 技 術 分 野

本発明は、カプトガニ・アメボサイト・ライセートを用いる  
エンドトキシンの測定剤に関する。

## 背 景 技 術

10

カプトガニ・アメボサイト・ライセート（以下、単にライセートという）を使用して、エンドトキシンを測定する方法が知られている。この方法は、ライセートが微量のエンドトキシンにより凝固することに基づいているが、その後の生化学的解明により、該凝固反応はいくつかの凝固因子の段階的活性化によりおこることが明らかにされている（中村隆範ほか、日本細菌学雑誌、38、781-803(1983)）。

15

すなわち、第1図に示すように、ライセートにエンドトキシンが加わるとC因子（エンドトキシン感受性因子、分子量123,000）を活性化して活性型C因子となり、これはB因子（分子量64,000）を限定水解し、活性化して活性型B因子となり、これはプロクロッティングエンザイム（分子量54,000）を活性化してクロッティングエンザイムに変換する。クロッティングエンザイムはコアギュローゲン（凝固タンパク、分子量19,723）のA r g<sup>18</sup>-T h r<sup>19</sup>とA r g<sup>46</sup>-G l y<sup>47</sup>の特定箇所を限定

20

25

水解することによりペプチドCを遊離し、コアギュローゲンを

コアギュリンに変換して凝固（ゲル化）させる。岩永らの方法（*Haemostasis*, 7, 183-188 (1978)）により、さらにこのコアギュローゲンの水解部位と共通のアミノ酸配列を持った合成ペプチド、すなわち発色合成基質 Boc-Leu-Gly-Arg-  
5 -p-ニトロアニリド（pNA）あるいは発蛍光合成基質 Boc-Leu-Gly-Arg-4-メチルクマリル-7-アミドとライセートを組み合わせた定量性のある測定法が知られている。

該測定法は、エンドトキシンが引金（トリガー）となって複数の凝固因子（全てセリンプロテアーゼ前駆体）を順次活性化  
10 するカスケード機構によって、最終的にコアギュリンゲルを形成するという一連の反応を利用している。

また、ライセート（ $1 \rightarrow 3$ ）- $\beta$ -D-グルカンが加わると、第1図におけるG因子を活性化して活性型G因子となり、これがプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイム  
15 に変換し、エンドトキシンの場合と同様にクロッティングエンザイムがコアギュローゲンをコアギュリンに変換してゲルを形成し、また合成基質を水解する（森田ら、*FEBS Lett.*, 129, 318-321 (1981)）。

20 このG因子に反応する物質としては（ $1 \rightarrow 3$ ）- $\beta$ -D-グルカン、クレスチン、レンチナンなど、さらにはセルロース系血液透析膜の洗浄液中及び該膜と接触した血液中に含まれる物質などが知られており、これらはいずれもウサギ発熱試験により発熱性を示さないことも認められている。

25 ところで、エンドトキシンはグラム陰性菌細胞壁の構成成分

としても知られ、特に血液中のエンドトキシンを測定することにより体内におけるグラム陰性菌の存在を検知することができるので、エンドトキシンを(1→3)-β-D-グルカンの影響を全く受けずに、高い感度で再現性良く測定し得る方法が特に臨床検査医学の分野で望まれている。

ライセート中のC因子系を用いることによりエンドトキシンを測定する方法が報告されている(大林ら、Clin. Chim. Acta. 149, 55-65 (1985))が、この方法はライセートをゲル濾過法によりあるいはヘパリンまたはデキストラン硫酸を固定化したアフィニティー担体を用いるクロマトグラフィーにより分画し、(1→3)-β-D-グルカン感受性のG因子を除去することにより、C因子、B因子とプロクロッティングエンザイムのみで再構成するもので、きわめて煩雑な操作を必要とする方法である。

#### 発 明 の 開 示

本発明は、(1→3)-β-D-グルカン感受性因子に対する抗体を使用し、(1→3)-β-D-グルカン感受性のG因子の影響を受けずに、ライセート中のC、B因子による反応を利用してエンドトキシンを測定する試薬に関する。

すなわち、本発明のエンドトキシンの測定剤は、

(1) ライセートと、(1→3)-β-D-グルカン感受性因子に対する抗体とからなるエンドトキシンの測定剤、および

(2) (1→3)-β-D-グルカン感受性因子に対する抗体を固定化した担体に、ライセートを接触させて得た(1→3)

— $\beta$ —D—グルカン感受性因子を実質的に含まないライセートからなるエンドトキシンの測定剤、である。

(1 $\rightarrow$ 3)— $\beta$ —D—グルカン感受性因子は、前述したように(1 $\rightarrow$ 3)— $\beta$ —D—グルカンによって活性化されるG因子であり、ライセートを用いてエンドトキシンを(1 $\rightarrow$ 3)— $\beta$ —D—グルカンの影響を受けることなく特異的に測定するには、ライセートに含まれるG因子の影響を排除しなければならない。このため本発明ではG因子に対する抗体をライセートと共に用いるか、または抗G因子抗体固定化によるG因子を実質的に含まないライセートを用いるものである。

本発明で使用するライセートは、リムルス・ポリフェムス(L. polyphemus、アメリカ産)、タキブレウス・ギガス(T. gigas、タイ国、マレーシア半島産)、タキブレウス・トリデンタツス(T. tridentatus、日本、中国産)、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ(C. rotundicauda、タイ国、マレーシア半島産)等のカプトガニから血リンパ液を採取し、次いで該血球を破碎し、その成分(ライセート)を分離する。ライセートは—40℃以下に小分けして保存し、必要に応じ凍結融解して使用するのが望ましい。

得られたライセートからG因子に対する抗体を製造するには、まず抗原となるG因子を精製しなければならないが、この方法としては、アガロース、セファロース(ファルマシア社販売、商品名)、またはその架橋体等の適当な担体にデキストラン硫酸、ヘパリン等を固定化したものにライセートを接触させ、G因子を含む画分を採取する方法を採用することができる。接触

させる方法としては、例えば、上記固定化物とライセートとを溶液中で接触させる方法、カラムクロマトグラフィーにより接触させる方法等を挙げることができる。

5 (1 → 3) -  $\beta$  - D - グルカン感受性因子を抗原とする抗体は、精製した (1 → 3) -  $\beta$  - D - グルカン感受性の G 因子または C、B 因子を含まない G 因子画分を抗原として使用し、これら抗原に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を製造する。

10 本発明で使用するポリクローナル抗体の製造方法としては、該抗原をウサギ、ヤギ等の被免疫動物に投与し、得られた抗体を、さらに精製することが望ましい。被免疫動物に投与する際に、補助剤（アジュバンド）を併用することは抗体産生細胞を賦活するので望ましい。

15 本発明で使用するモノクローナル抗体の製造方法としては、該抗原をマウスまたはラットの腹腔内に投与した後に脾臓などを摘出し、該脾臓などから採取した細胞と腫瘍細胞株であるミエローマ細胞とを細胞融合させて、ハイブリドーマを樹立し、得られたハイブリドーマを試験管内にて連続増殖させ、さらに得られたハイブリドーマから上記抗原に対する特異抗体を連続的に産生する細胞株を選別し、この選別株を試験管内培養またはマウスの腹腔などの生体内にて培養することによって、モノクローナル抗体を大量に製造する方法を挙げることができる。

20 細胞融合に用いる細胞としては、脾細胞以外にリンパ節細胞および末梢血中のリンパ細胞等を用いることができる。また、ミエローマ細胞株は、異種細胞種由来のものに比べ同種細胞株由

25

来のものが望ましく、安定な抗体産生ハイブリドーマを得ることができる。

得られたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の精製法としては、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム等の中性塩による塩析、低温アルコール沈澱およびポリエチレングリコールまたは等電点による選択的沈澱分別法、ないしは電気泳動、DEAE-、CM-誘導体等のイオン交換体やプロテインAならびにハイドロキシアパタイト吸着体による吸脱着法、ゲル濾過および超遠心法等を挙げることができる。

10        エンドトキシンを測定する上記(1)の方法において、該抗体をライセートとエンドトキシン溶液中に存在させるには、例えばライセートの凍結乾燥品を蒸留水あるいは適当な緩衝液で溶解して調製した溶液に、該抗体溶液を添加する方法、ライセート中に予め必要量の抗体溶液を共存させ凍結乾燥して得た試薬を  
15        蒸留水あるいは適当な緩衝液で溶解して用いる方法、ライセートと合成基質の凍結乾燥品を適当な緩衝液等で溶解して調製した溶液に、該抗体溶液を添加する方法、ライセートと合成基質の混合液中に予め必要量の抗体溶液を共存させ凍結乾燥して得た試薬を蒸留水あるいは適当な緩衝液で溶解して用いる方法、  
20        および必要量の該抗体溶液を試料に添加する方法等が挙げられる。

また、上記(2)の方法に用いる該抗体の固定化担体にライセートを接触させてG因子を含まないライセートを得る方法としては、該担体にライセートを接触させた後に、遠心分離、濾過等の手法により該担体を除去する方法、あるいは該担体を充填し  
25



たカラムにライセートを添加してその素通り画分を集める方法等が挙げられる。

5       該抗体の固定化担体としては、例えばセルロファイン（生化学工業株式会社販売、商品名）またはセファロース等の適当な担体の水酸基と、抗体のアミノ基とを通常の方法により共有結合させた固定化担体を用いることができる。担体としては、この他にもセルロース、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、多孔性シリカビーズ等を用いることができる。

10       さらにこれらの担体に該抗体を固定化させる方法として、担体に活性基を導入したのち、抗体を結合させる方法、例えば担体をエポキシ活性化後ホルミル化したのち、抗体を結合させる方法等を挙げることができる。

15       ライセートを固定化担体に接触させる場合のpHとしては、ライセート中のC因子およびエンドトキシンとC因子により開始される経路に関与する凝固因子が不活化されない程度のpHであれば良いが、好ましくはpH6～9の範囲が好ましい。また、接触させる場合の温度としては、該凝固因子が同様に不活化されない温度であれば良いが、通常0～45℃、より好ましくは0～10℃である。

20       本発明により、エンドトキシンを測定する生体試料としては、血液、血漿または血清の他に、脳脊髄液、腹水、関節液、胸水、乳汁および尿などの体内外の浸出または排泄液を挙げることができる。たとえば、血漿を試料とするときは、ヘパリン、EDTA、クエン酸等の抗凝固剤を加えて分離することが必要である。

25

本発明の測定剤を用いてエンドトキシンを測定するには、合成基質、例えば、前述の発色合成基質あるいは発蛍光合成基質を反応液中に共存させ、クロッティングエンザイムのアミダーゼ活性を測定する各種の方法、凝固反応によるゲル形成の有無を肉眼的に調べるゲル化法、凝固に伴って生ずる濁度を適当な光学系を用いて測定する比濁法、一定の濁度に達するまでの時間を適当な光学系を用いて測定する比濁時間分析法、凝固に伴って生ずる粘性の変化を共振周波数の変化としてとらえ、水晶振動子ゲル化測定装置を用いて測定する方法等を採用することができる。

本発明のエンドトキシンの測定剤は、G因子に対する抗体を使用しているので、少量でも優れたG因子に対する特異的結合能および中和効果を示すことが第一の特徴である。また、該抗体はリムルス反応阻害物質として知られているアンチトリプシン、アンチトロンビンⅢ等のセリンプロテアーゼインヒビター類を含まず、C因子活性を損なわないことが第二の特徴である。

#### 図面の簡単な説明

- 第1図はカプトガニ血液凝固系のカスケード機構を示す。
- 第2図はA剤、D剤の(1→3)-β-D-グルカンに対する反応性を示す。第3図はA、D剤の *E. coli* 0111 : B 4 エンドトキシンに対する反応性を示す。第4図は *Salmonella enteritidis* エンドトキシンの水及び(1→3)-β-D-グルカン添加希釈液に対するD剤の反応性を示す。
- 第5図は実施例8～10の *E. coli* 0111 : B 4 エンドトキ

シンの検量線を示す。

第6図は実施例8の血漿検体中のエンドトキシン測定結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 5       以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的に説明するが、  
本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 実施例1

##### G因子に対するポリクローナル抗体の製造

- 10       カプトガニ血リンパ液1.0ℓを4℃下に、1,500rpmで10分  
間遠心し、その沈澱部分（アメーボサイト）約50gに250ml  
の0.02Mトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）を加え、ホモゲナイ  
ザー（ポリトロンR PT10（商標）、Kinematica社製）にて  
均一に破碎及び抽出し、冷却遠心分離機（トミー精工RD-  
20Ⅲ）にて、10,000rpmで30分間遠心した。得られた沈澱  
15       物をさらに150mlの同上緩衝液にて2回抽出し、最終的に5  
50mlのライセートを得た。

- 同ライセート全量を、デキストラン硫酸固定化セファロース  
CL-6Bカラム（5×23cm、0.05M NaCl含有0.02M  
トリスー塩酸緩衝液（pH8.0）で平衡化）に添加し、0.2M  
20       NaCl含有0.02Mトリスー塩酸緩衝液（pH8.0）にて溶出さ  
れる画分、すなわち第1図に示すG因子を含むG因子画分を、  
後記する大林らの方法（Clin, Chim, Acta、149, 55-65(1985)）  
により、その活性を測定した。ついでその50mlを10mlに減  
圧濃縮後、G因子の活性化を防ぐために0.23gのEDTA-  
25       4Naを添加した。

10

その 1.0 ml に等量のフロイントコンプリートアジュバンド  
(ヤترون社販売、商品名) を加え、ウサギ (JW、♂ 2.5 kg)  
の背中、尻および横腹のそれぞれに 0.3 ml、0.3 ml および 0.4  
ml ずつ皮下注射 (感作) した。感作は 2 週間に 1 度計 5 回行い、  
5 ゲル内二重拡散法により抗体価の上昇を確認後、最終感作日より  
1 週間後に頸静脈を切開して全採血した。ひきつづき室温 1  
時間、4 °C 一晚放置後、2,000rpm で 5 分間遠心分離を行い、得  
られた血清 5.2 ml を 5.6 °C で 30 分間の熱処理を行い非働化し  
た。その血清の 5.0 ml に対して 3.4 % (W/V)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液を 5.0  
10 ml 加え、生じた沈澱を 10,000rpm で 30 分間遠心分離し、得た  
沈澱を 1.7 % (W/V)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液で 2 回洗浄し、その沈澱を 0.1  
M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 5.0 ml に溶解した。この溶液  
に、固形の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  7.5 g を攪拌しながら溶かし込み、生じた沈  
澱を上記と同様のトリス-塩酸緩衝液に溶かし、さらに  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
15 濃度 7.5 g / 5.0 ml の条件で沈澱操作を 3 回繰り返し、最終沈  
澱を上記緩衝液に溶解した。ひきつづき 0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で平  
衡化したセルロファイン GH-20m (生化学工業株式会社販売、商  
品名) カラム (2.8 × 90 cm、0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で溶出) を通  
過させ脱塩した後、凍結乾燥し、ウサギ抗 (G 因子画分) 血清  
20 の IgG 画分を得た。

## 〔G 因子活性測定法〕

0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0、0.013 M  $\text{MgCl}_2$  含有)  
0.1 ml に、(1 → 3) -  $\beta$  - D - グルカン (カードラン; 和光  
純薬工業販売、商品名; 400 ng/ml) 0.03 ml、各画分 0.05  
25 ml、0.005 M N - ターシャリープトキシカルボニル (Boc)

1 1

- L e u - G l y - A r g - p N A (p-ニトロアニリド)  
0.02 mlと凝固酵素前駆体(プロクロッティングエンザイム)  
0.05 mlを加え、37℃で反応させる。発色が認められること  
を確認し、0.6 Mの酢酸0.8 mlを添加することにより反応を停  
止し、次いで405 nmの吸光度を測定する。

## 実施例 2

## 精製G因子に対するポリクローナル抗体の製造

カプトガニ血リンパ1.2 lを4℃下に1,500rpmで10分間遠  
心し、その沈澱部分(アメーボサイト)約53 gに250 mlの  
0.02 M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0、0.001 M ベンズアミジ  
ン、0.001 M E D T A - 4 Na含有)を加え、実施例1と同様  
に破碎、抽出後、10,000rpmで30分間遠心した。得られた沈  
澱を200 mlの同上緩衝液にてさらに2回抽出し、最終的に  
640 mlのライセートを得た。

同ライセート全量を、デキストラン硫酸固定化セファロース  
CL-6B カラム(5×23.5 cm、0.02 M トリス-塩酸緩衝液、  
pH8.0で平衡化)に添加し、0.2 M NaCl含有0.02 M トリス  
-塩酸緩衝液(pH8.0)にて溶出されるG因子画分をカラムラ  
イト(生化学工業販売、商品名)カラム(3.0×29.6 cm、  
0.02 M トリス-塩酸緩衝液、pH8.0で平衡化)に添加し、  
0.02 M トリス-塩酸緩衝液、pH8.0および0.5 M 炭酸水素ア  
ンモニウム各800 mlで洗浄後、2 M 炭酸水素アンモニウムに  
て溶出し、精製G因子を得た。

上記により精製したG因子溶液50 mlを10 mlに濃縮後、G  
因子の活性化を防ぐため0.23 gのE D T A - 4 Naを添加した。

## 1 2

その 1.0 ml に等量のフロイントコンプリートアジュバントを加え、ウサギ（JW、♂、2.5 kg）の背中、尻および横腹のそれぞれに 0.3 ml、0.3 ml および 0.4 ml ずつ皮下注射（感作）した。感作は 2 週間に 1 度計 5 回行い、ゲル内二重拡散法により抗体価の上昇を確認後、最終感作日より 1 週間後に頸静脈切開により全採血した。ひきつづき室温 1 時間、4℃一晩放置後、2,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、得られた血清 6.5 ml を 56℃で 30 分間の熱処理を行い非働化した。その 50 ml の血清に対して 3.4% (W/V)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液を 50 ml 加え、生じた沈澱を 10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、沈澱を 1.7% (W/V)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  溶液で 2 回洗浄し、その沈澱を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 50 ml に溶解した。この溶液に固形の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  7.5 g を攪拌しながら溶かし込み、生じた沈澱を上記と同様のトリス-塩酸緩衝液に溶かし、さらに  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  濃度 7.5 g / 50 ml の条件で沈澱操作を 3 回繰り返す、最終沈澱を上記緩衝液に溶解した。ひきつづき 0.05 M の  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で平衡したセルロファイン GH-20m カラム (2.8 × 90 cm、0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  にて溶出) を通過させ脱塩した後、凍結乾燥し、抗 G 因子血清の IgG 画分を得た。

## 20 実施例 3

## 精製 G 因子に対するモノクローナル抗体の製造

実施例 2 で得られた G 因子 0.5 ml (タンパク量、200  $\mu\text{g}$  / ml) を等量のフロイントコンプリートアジュバントと混合し、マウス (BALB/C、5 週令、体重 25 g) の背中に 0.2 ml および尻に 0.3 ml を皮下注射し、2 度目の感作を 2 週目に行

## 1 3

い、3週後に $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ のG因子 $0.3 \text{ ml}$ を静脈内投与し最終免疫とした。これより4日後に $9.2 \times 10^7$ 個の脾細胞を分離し、マウスミエローマSP/0細胞の $1.8 \times 10^7$ 個と常法により融合させて、ハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマにつき、G因子に結合すること、またはG因子活性を中和させることができることを確認した。つづいて、上記と同様のマウス腹腔内にプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を $0.2 \text{ ml}$ 投与し、1週後にハイブリドーマ $3 \times 10^7$ 個/匹を腹腔内に投与し、腹水の大量貯留がみられる2週目に腹水を回収し、40%飽和硫酸アンモニウムでIgG画分を沈澱させ、最終的な腹水型モノクローナル抗体を得た。

## 実施例 4

抗G因子抗体固定化セルロファインによるG因子不含ライセートの調製

実施例1に記載の方法で得られたライセート $100 \text{ ml}$ を、 $0.1 \text{ M}$ トリス-塩酸緩衝液(pH8.0、 $0.15 \text{ M}$  NaCl含有)で平衡化したエンドトキシンおよび $\beta$ -グルカン不含の抗G因子抗体固定化セルロファイン(調製方法は後記)カラム( $1.2 \times 11 \text{ cm}$ )に添加し、 $0.1 \text{ M}$ トリス-塩酸緩衝液(pH8.0、 $1 \text{ M}$  NaCl含有)にて洗浄後、素通りした非吸着画分を集め、G因子を実質的に含まないG因子不含ライセートを得た。

## 〔抗G因子抗体固定化セルロファインの調製方法〕

ホルミルセルロファイン $10 \text{ g}$ を $0.1 \text{ M}$ リン酸-Na緩衝液(pH7.1)で充分洗浄し、実施例1~3に記載のG因子に対する抗体溶液( $10 \text{ mg}/\text{ml}$   $0.1 \text{ M}$ リン酸-Na緩衝液、pH7.1)

## 1 4

20 mlに懸濁し、 $\text{NaCNBH}_3$  50 mgを加え溶解させる。ひきつづき室温で8時間ゆるやかに攪拌し、0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄、濾過し、10 mgの $\text{NaCNBH}_3$ を含む5 mlの上記緩衝液を加え、室温で3時間振とうする。その後、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0、0.15 M NaCl含有) で充分洗浄する。

## 実施例 5

## エンドトキシンの測定

以下の方法で3種類の試薬を調製し、3種類の試料についてその反応性を比較検討した。

A剤は、ライセート440  $\mu\text{l}$ 、塩化マグネシウム440  $\mu\text{mol}$ 、およびBoc-Leu-Gly-Arg-pNA 2.86  $\mu\text{mol}$ を混合し、凍結乾燥して調製した。B剤は、A剤の成分に実施例1で調製した抗G因子画分血清のIgG画分の10 mg / ml 0.02 M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 180  $\mu\text{l}$ を添加、混合し、凍結乾燥して調製した。C剤はA剤の成分に実施例2で調製した抗G因子血清のIgG画分の10 mg / ml 0.02 M トリス-塩酸緩衝液 180  $\mu\text{l}$ を添加、混合し、凍結乾燥して調製した。

3種類の試薬それぞれを2.2 mlの0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) に溶解させ、その溶液0.1 mlを試験管に分注し、そこへ試料0.1 mlを添加してよく混合し、37℃にて30分間反応させた。3種類の試薬に対する試料の反応性は、30分後に生じたpNAを、0.5 mlの0.04%亜硝酸ナトリウム (0.48 M塩酸溶液)、0.3%スルファミン酸アンモニウム、0.07%



N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩を順次添加して発色させ、545 nmの吸光度値で示した。その結果を第1表に示した。この結果から、G因子画分に対するポリクローナル抗体及びG因子に対するポリクローナル抗体を添加して調製した試薬を用いれば、(1→3)- $\beta$ -D-グルカンの影響を受けずに、エンドトキシンを特異的に定量することができることは明らかである。

(以下余白)

第 1 表

試 料		反 応 性 ( Δ A545nm/30min)		
(pg/tube)		A 剤	B 剤	C 剤
エンドトキシン*	ゲルカン**	抗体なし	G 因子画分抗体	G 因子抗体
	3.0	0.242	0.001	0.001
2.5		0.447	0.445	0.448
2.5	3.0	0.691	0.447	0.446

\* ... E. coli 0111:B4 由来  
\*\* ... カードラン

## 実施例 6

## エンドトキシンの測定

以下の方法で2種類の試薬を調製し、エンドトキシン及び  
(1→3)- $\beta$ -D-グルカンに対する反応性を比較検討した。

5 A剤は、ライセート440  $\mu$ l、塩化マグネシウム440  $\mu$ モル、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA 2.86  $\mu$ モルを混合し、凍結乾燥して調製した。D剤はA剤の成分に、実施例3で調製した精製G因子に対して中和能のあるモノクローナル抗体を含む溶液80  $\mu$ lを添加し、凍結乾燥して調製した。

10 2種類の試薬それぞれ2.2 mlの0.2 Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解させ、その溶液0.1 mlを試験管に分注し、そこへ試料0.1 mlを添加してよく混合し、37℃にて30分間反応させた。2種類の試薬に対する試料の反応性は、30分後に生じたpNAを0.5 mlの0.04%亜硝酸ナトリウム(0.48 M塩酸溶液)、0.3%スルファミン酸アンモニウム、0.07%N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩を順次添加して発色させ、545 nmの吸光度値で示した。

第2図は(1→3)- $\beta$ -D-グルカンに対する反応性を比較した実験結果である。A剤は(1→3)- $\beta$ -D-グルカン  
20 に対して濃度依存的に反応するが、D剤は1,000 ng/mlの(1→3)- $\beta$ -D-グルカンに対しても全く反応しない。この結果は、精製G因子に対するモノクローナル抗体が、ライセート中のG因子を完全に中和し、(1→3)- $\beta$ -D-グルカンに対する反応性を消失させていることを示している。

25 第3図は、A、D両試薬のエンドトキシンに対する反応性を

## 1 8

用量反応曲線で比較した結果である。2つの試薬の用量反応曲線はほとんど一致しており、このことはD剤に含まれる精製G因子に対するモノクローナル抗体が、ライセートのエンドトキシンに対する反応性に全く影響を与えないことを示している。

5 第4図はエンドトキシンの蒸留水による希釈系列と、100 ng/mlの(1→3)-β-D-グルカン溶液による希釈系列に対するD剤の用量反応曲線である。2つの用量反応曲線はほとんど一致しており、このことは、D剤を用いれば、試料中に混在する(1→3)-β-D-グルカンには全く影響されずにエンドトキシンを特異的に定量できることを示している。

10 以上の結果から、精製G因子に対するモノクローナル抗体を添加して調製した試薬を用いれば、(1→3)-β-D-グルカンの影響を受けずに、エンドトキシンを特異的に定量することができることは明らかである。

15 実施例 7

エンドトキシンの測定

以下の方法で2種類の試薬を調製し、3種類の試料についてその反応性を比較検討した。

20 A剤は、ライセート440 μl、塩化マグネシウム440 μmolおよびBoc-Leu-Gly-Arg-pNA 2.86 μmolを混合し、凍結乾燥して調製した。E剤は、実施例4で調製したG因子不含ライセート440 μl、塩化マグネシウム440 μmol、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA 2.86 μmolを混合し、凍結乾燥して調製した。

25 2種類の試薬それぞれを2.2 mlの0.2 Mトリス-塩酸緩衝液

(pH8.0) に溶解し、その溶液 0.1 ml を試験管に分注し、そこへ試料 0.1 ml を添加してよく混合し、37℃にて30分間反応させた。2種類の試薬に対する試料の反応性は、30分後に生じた pNA を、0.5 ml の 0.04% 亜硝酸ナトリウム (0.48 M 塩酸溶液)、0.3% スルファミン酸アンモニウム、0.07% N- (1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩を順次添加して発色させ、545 nm の吸光度値で示した。その結果を第2表に示した。この結果から、G 因子不含ライセートを用いて調製した試薬によれば、(1→3)-β-D-グルカンの影響を全く受けずに、エンドトキシンを特異的に定量することができることは明らかである。

(以下余白)

第2表

試料 (pg/tube)		反応性 ( $\Delta A_{545nm}/30min$ )	
エンドトキシン*	ゲルカン**	A 剤 ライセート	E 剤 G因子不含ライセート
2.5	3.0	0.227	0.001
		0.439	0.437
2.5	3.0	0.668	0.439

\* ... E. coli 0111:B4 由来

\*\* ... カードラン

## 2 1

## 実施例 8

## 血漿検体の測定

対象は、グラム陰性菌による敗血症を疑った自治医大血液科  
に入院中の白血病等の重症血液疾患および感染を合併した肝、  
胆道疾患を有する患者の 25 例で、それぞれ無菌的に採血した  
5 ヘパリン加血液を試料として、4℃で  $150 \times G$ 、10 分間遠  
心して多血小板血漿 (PRP) を得た。その 0.1 ml に 0.32 M  
の過塩素酸 0.2 ml を加え、37℃で 20 分間加温し、析出物を  
遠心 (3,000rpm、10 分間) 除去し、その上清 0.05 ml に 0.18  
10 M NaOH を 0.05 ml 加えて中和し被検液とした。

ひきつづき実施例 6 に記載の方法で調製した、本発明による  
エンドトキシン測定剤 0.1 ml を加え、37℃で 30 分間加温し  
た。この溶液に 0.04% 亜硝酸ナトリウム (0.48 M 塩酸溶  
液)、0.3% スルファミン酸アンモニウム、0.07% N- (1  
15 -ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩の各 0.5 ml を順次加え  
てジアゾカップリングし、545 nm でその吸光度を測定し、別  
に作成した検量線 (第 5 図) の a より E. coli 0111: B4 エン  
ドトキシン換算値として表わした。第 6 図に示すように 25 例  
全例において高濃度のエンドトキシンが検出され (健常人 25  
20 例:  $0.8 \pm 0.6 \text{ pg/ml}$ )、そのうちの 3 例 (\*印) は血培にて、  
イシェリキア・コリ (Escherichia coli)、シュードモナス・  
エルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa)、クレブシェラ・ニ  
ューモニエ (Klebsiella pneumoniae) をそれぞれ検出し、残り  
の 22 例は血培では陰性であったが、発熱、白血球数、その他  
25 臨床症状及び抗生物質感受性よりグラム陰性菌敗血症と診断さ

## 2 2

れた。従って、本発明方法は通常の検査法では診断がきわめて困難なグラム陰性菌敗血症の迅速診断法としてきわめて有力な手法として評価されうるものであることが理解できよう。

## 実施例 9

## 5 尿検体の測定

自治医大に入院中に尿路感染症を併発した症例で、尿培養でイシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)を検出した 3 症例につき、本発明方法による尿中エンドトキシンの定量を行った。

10 尿は中間尿を無菌的に滅菌採尿コップに採取し、その 0.005 ml に実施例 7 に記載の本発明方法によるエンドトキシン測定剤 0.2 ml を加え、37℃で30分間加温した。実施例 8 と同様にジアゾカップリング後、545 nm でその溶液の吸光度を測定し、別に作成した検量線 (第 5 図) の b より *E. coli* 0111 : B 4  
15 エンドトキシン換算値として表わした。第 3 表に示すように 3 例中全例において高濃度のエンドトキシンが検出され (健常人 : 60 pg/ml 以下)、本発明方法はグラム陰性菌尿路感染症の迅速確定診断法として、きわめて有力な手法であることが理解できよう。

20

(以下余白)



2 3

## 第 3 表

## グラム陰性菌感染症の尿中エンドトキシン濃度

5	No.	検出菌	CFU * /ml	エンドトキシン (ng/ml)
	1	Escherichia coli	>10 <sup>5</sup>	1056.5
	2	Serratia marcescens	>10 <sup>3</sup>	18.0
10	3	Serratia marcescens	>10 <sup>4</sup>	216.7

\* コロニー形成単位

## 実施例 10

## 脳脊髄液検体の測定

自治医大に入院中に髄膜炎を疑われ、髄液中にシュードモナス・エルギノーサ (Pseudomonas aeruginosa) およびヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) を検出した細菌性髄膜炎の 3 症例につき、本発明方法によるエンドトキシンの定量を行った。

腰椎穿刺にて無菌的に採取した髄液 0.05 ml に注射用蒸留水 0.05 ml を加え、さらに実施例 5 に記載の本発明方法によるエンドトキシン測定剤 0.1 ml を加え、37℃で30分間加温した。実施例 8 と同様にジアゾカップリング後、545 nm でその溶液の吸光度を測定し、別に作成した検量線 (第 5 図) の b より E.coli 0111 : B 4 エンドトキシン換算値として表わした。第

4 25 表に示すように、3 例中全例において高濃度のエンドトキシンが検出され (健常人 : 3 pg/ml 以下)、本発明方法はグラム陰性菌髄膜炎の早期迅速診断法としてきわめて有力な手法として評価され得るものであることが理解できよう。

24

第4表

グラム陰性菌感染髄液の髄液中エンドトキシン濃度

No	検出菌	エンドトキシン (pg/ml)
5	1 Pseudomonas aeruginosa	75.5
	2 Pseudomonas aeruginosa	108.5
	3 Haemophilus influenzae	34.6

10

## 産業上の利用可能性

以上述べたように、本発明はライセートを用いたエンドトキシンに特異的な測定剤を提供するものであり、血液や尿、髄液等の生体試料中に存在するグラム陰性菌由来のエンドトキシンを迅速簡便かつ高い精度で測定することが可能であり、グラム陰性菌血症ならびにエンドトキシン血症の迅速な診断ならびに治療効果の判定に役立つもので、特に臨床検査医学に貢献するところ大である。

15

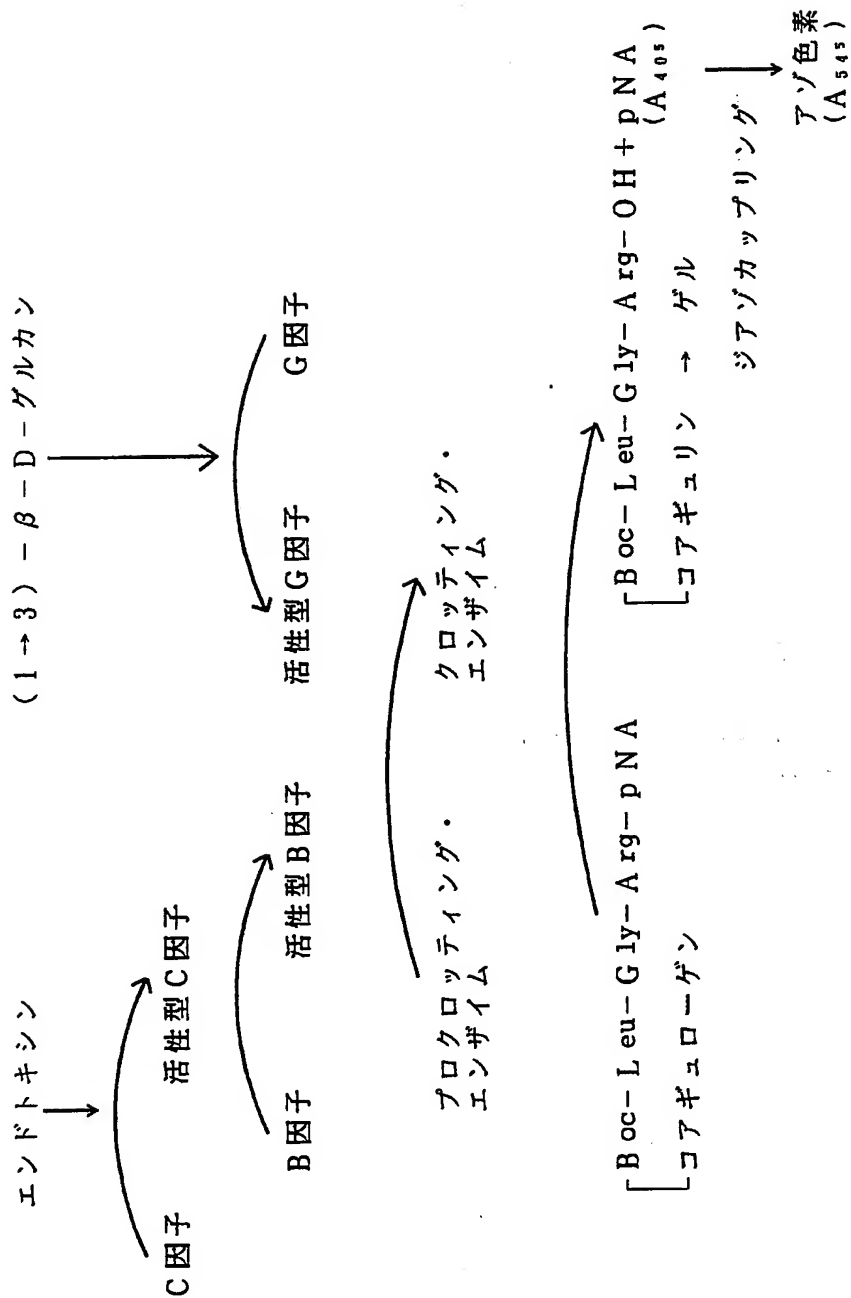
20

さらに本発明は、注射用蒸留水、医療用具および注射薬を汚染したエンドトキシンを迅速かつ正確に測定することを可能とし、これらはいずれも本発明の副次的効果として、とくに医薬品製造分野に貢献するところ大である。

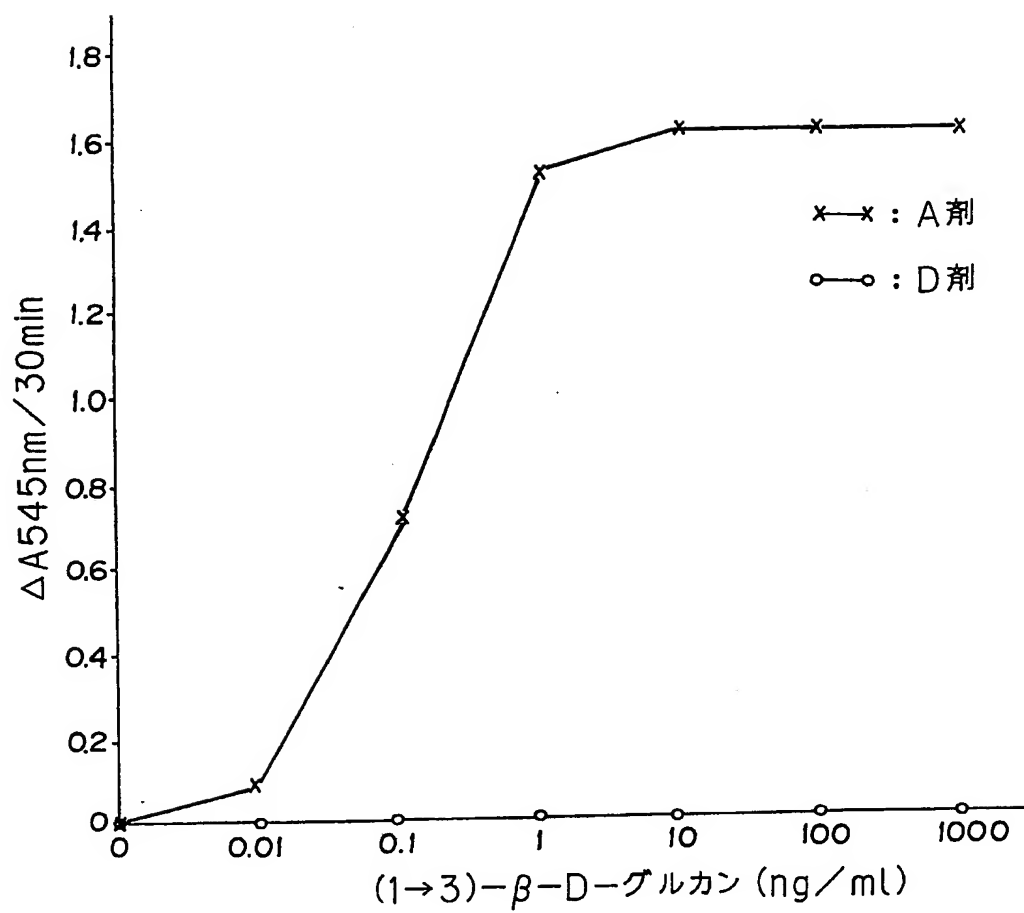
## 請求の範囲

1. カプトガニ・アメボサイト・ライセート及び(1→3)- $\beta$ -D-グルカン感受性因子に対する抗体を含有してなるエンドトキシンの測定剤。  
5
2. 請求項1記載のエンドトキシンの測定剤において、抗体がモノクローナル抗体である測定剤。
3. 請求項1記載のエンドトキシンの測定剤において、抗体がポリクローナル抗体である測定剤。
- 10 4. カプトガニ・アメボサイト・ライセート、(1→3)- $\beta$ -D-グルカン感受性因子に対する抗体及び合成基質を含有してなるエンドトキシンの測定剤。
5. 請求項4記載のエンドトキシンの測定剤において、抗体がモノクローナル抗体である測定剤。
- 15 6. 請求項4記載のエンドトキシンの測定剤において、抗体がポリクローナル抗体である測定剤。
7. (1→3)- $\beta$ -D-グルカン感受性因子に対する抗体を固定化した担体にカプトガニ・アメボサイト・ライセートを接触させて得た(1→3)- $\beta$ -D-グルカン感受性因子を実質的に含まないライセートを含有するエンドトキシンの測定剤。  
20
8. 請求項1～7記載のいずれか1項のエンドトキシンの測定剤において、該測定剤が凍結乾燥品であることを特徴とする測定剤。
9. 請求項7記載のエンドトキシンの測定剤において、固定化抗体がセルロース、アガロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、多孔性シリカビーズに固定化された抗体である測定剤。  
25

1/6

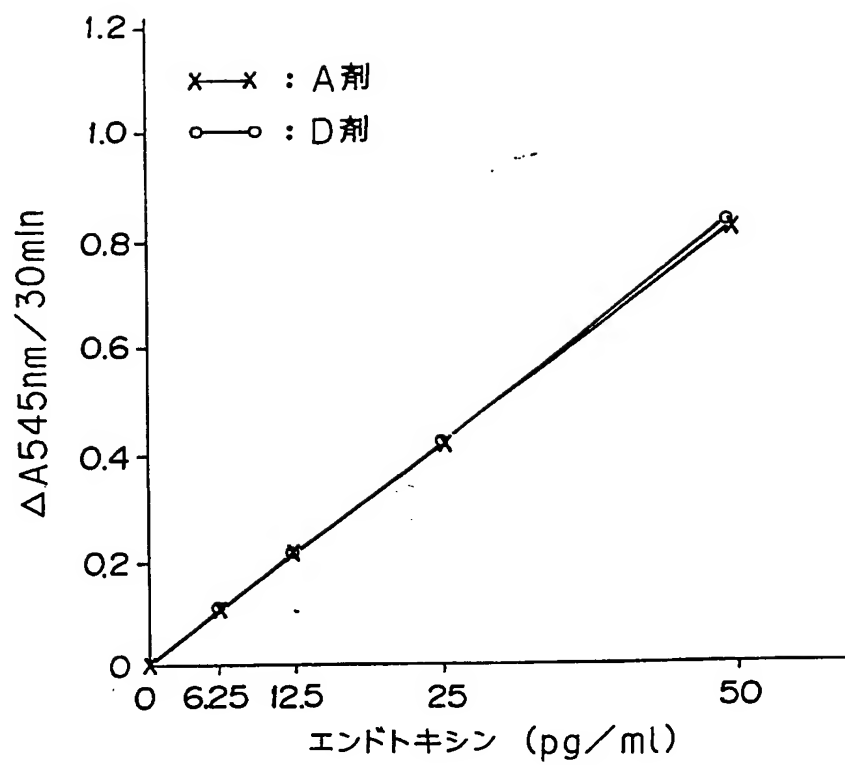


- 2/6 -



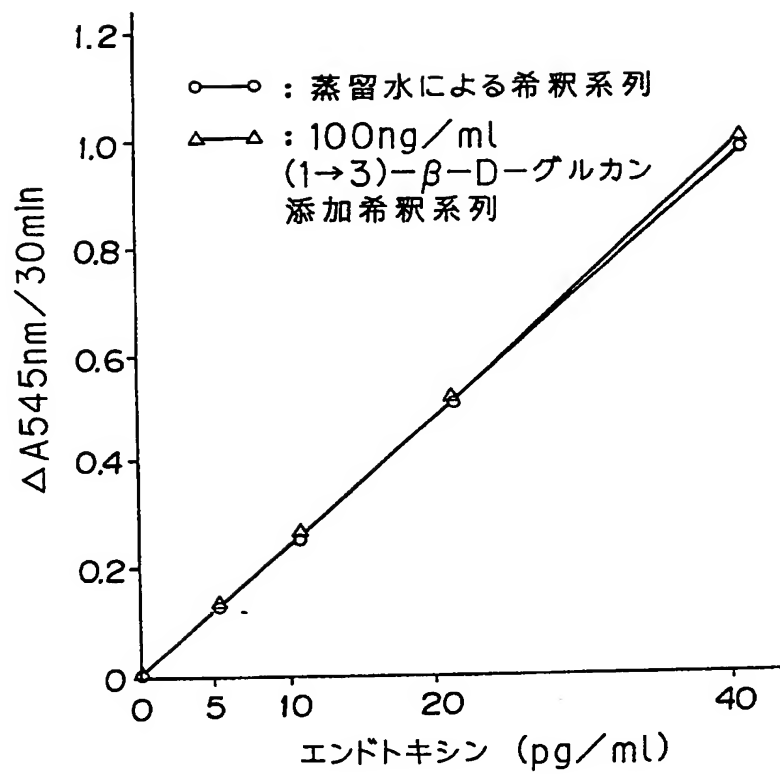
第 2 図

- 3/6 -



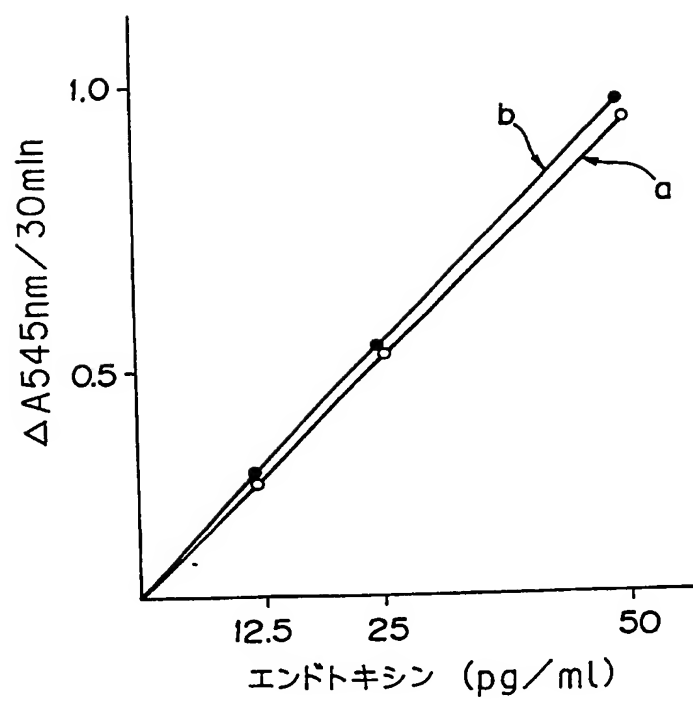
第 3 図

- 4/6 -



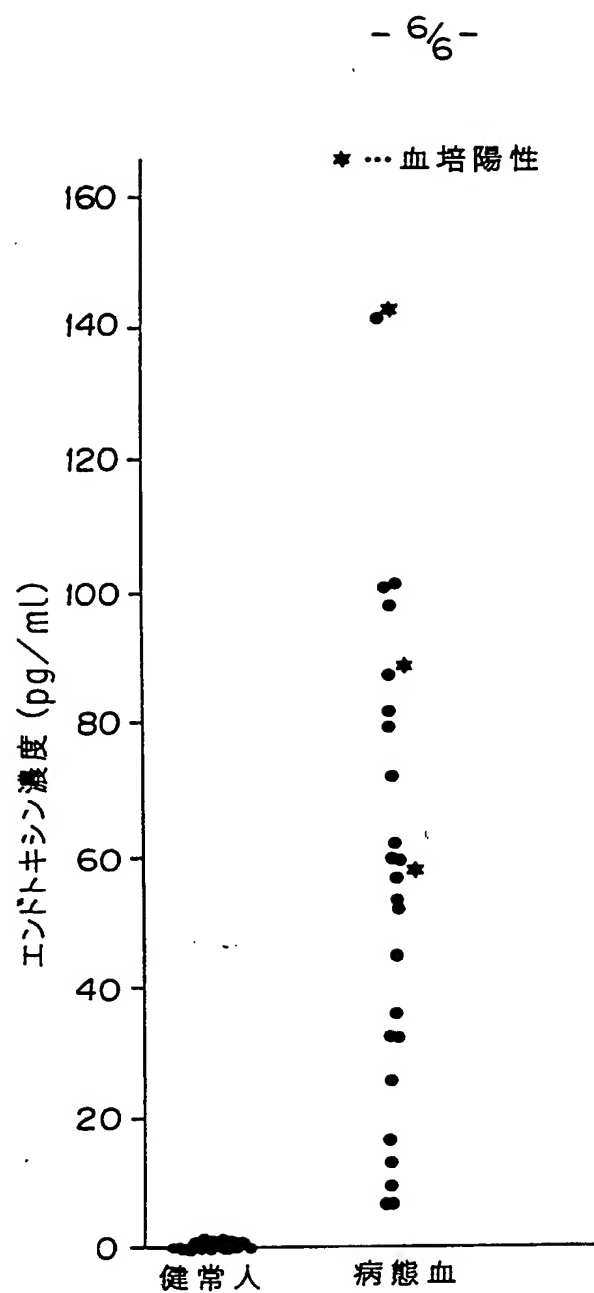
第 4 図

- 5/6 -



第 5 図





第 6 図

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP91/01118

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> G01N33/579		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	G01N33/579, G01N33/573	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
Jitsuyo Shinan Koho	1926 - 1990	
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1990	
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> *		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages **	Relevant to Claim No. **
Y	JP, A, 1-235852 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), September 20, 1989 (20. 09. 89), (Family: none)	1-9
Y	JP, A, 59-27828 (Seikagaku Kogyo K.K.), February 14, 1984 (14. 02. 84), (Family: none)	1-9
Y	JP, A, 1-219562 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), September 1, 1989 (01. 09. 89), (Family: none)	1-9
Y	JP, A, 58-13516 (Seikagaku Kogyo K.K.), January 26, 1983 (26. 01. 83), (Family: none)	1-9
Y	JP, A, 1-503808 (E.I.DuPont de Nemours and Co.), December 21, 1989 (21. 12. 89), & WO, A, 89/00446	7-9
<p>* Special categories of cited documents: **</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
September 9, 1991 (09. 09. 91)	September 24, 1991 (24. 09. 91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
Japanese Patent Office		

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y

JP, A, 60-125565 (Amano Pharmaceutical  
Co., Ltd.),  
July 4, 1985 (04. 07. 85),  
(Family: none)

1-6

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers . because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claim numbers . because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claim numbers . because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国 際 調 査 報 告

国際調査番号PCT/JP 91/01118

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>8</sup> G 01 N 33 / 579		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分類体系	分類記号	
IPC	G 01 N 33 / 579, G 01 N 33 / 573	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
日本国実用新案公報 1926-1990年 日本国実用新案公報 1971-1990年		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP, A, 1-235852 (和光純薬工業株式会社), 20. 9月. 1989 (20. 09. 89), (ファミリーなし)	1-9
Y	JP, A, 59-27828 (生化学工業株式会社), 14. 2月. 1984 (14. 02. 84), (ファミリーなし)	1-9
Y	JP, A, 1-219562 (和光純薬工業株式会社), 1. 9月. 1989 (01. 09. 89), (ファミリーなし)	1-9
Y	JP, A, 58-13516 (生化学工業株式会社), 26. 1月. 1983 (26. 01. 83), (ファミリーなし)	1-9
Y	JP, A, 1-503808 (イー・アイ・デュポン・ド・ネモアース・アンド・コンパニー), 21. 12月. 1989 (21. 12. 89), &WO, A, 89/00446	7-9
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
09. 09. 91	24.09.91	
国際調査機関	権限のある職員	2 J 9 0 1 5
日本国特許庁 (ISA/JP)	特許庁審査官	秋 月 美紀子

第2ページから続く情報

Y	<p>( Ⅲ の読み )</p> <p>JP, A, 60-125565 ( 天野興業株式会社 ), 4. 7月. 1985 ( 04. 07. 85 ), ( ファミリーなし )</p>	1-6
---	--	-----

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲でありかつ PCT 規則 6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. ☐ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

- ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
- ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。  
請求の範囲 \_\_\_\_\_
- ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。

☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。